PROF. GIULIO VASSALE

ORDINARIO DI PATOLOGIA GENERALE NELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA

SUL SIGNIFICATO FISIOLOGICO

DELLE PIASTRINE DEL SANGUE

IN MODENA

COI TIPI DELLA SOCIETÀ TIPOGRAFICA MODENESE

ANTICA TIPOGRAFIA SOLIANI

1901.

PROF. GIULIO VASSALE
ORDINARIO DI PATOLOGIA GENERALE NELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA

SUL SIGNIFICATO FISIOLOGICO
DELLE PIASTRINE DEL SANGUE

IN MODENA
COI TIPI DELLA SOCIETÀ TIPOGRAFICA MODENESE
ANTICA TIPOGRAFIA SOLIANI

1901.

Estratto dalle *Memorie della R. Accademia di Scienze, Lettere ed Arti in Modena*
Serie III, Vol. IV (*Sezione di Scienze*).

Fin dal 1894 io (1) pubblicai su questo argomento una nota preliminare, nella quale veniva ad ammettere che la formazione delle piastrine del sangue avviene, più o meno rapidamente, in circolo in stretto rapporto coi processi delle combustioni respiratorie, e che la piastrina rappresenta uno stadio regressivo normale del globulo rosso. Se a quella nota non seguì la descrizione dei metodi di tecnica microscopica adoperati e la pubblicazione per esteso delle mie ricerche, non dipese dalla mia volontà.

Finchè fui medico settore nell'Istituto Psichiatrico di Reggio, fui continuamente occupato nelle ricerche sperimentali intorno alle ghiandole paratiroidee. Dopo il mio passaggio a Modena fui sempre in attesa del laboratorio di patologia generale, di cui finalmente starà fra breve per essere fornita anche la nostra Università. Nel nuovo laboratorio, in omaggio alla venerata memoria del mio compianto Maestro Bizzozero, il cui nome resterà perennemente legato all'ematologia, mi propongo con nuove ricerche di riprendere lo studio delle piastrine e della funzione ematopoietica del midollo osseo, ben lieto se insistendo con grande amore in questi difficili studî riuscirò a portare all'arduo argomento qualche modesto contributo, che stia a dimostrarmi allievo non indegno del mio illustre rimpianto Maestro.

---

(1) Vassale, *Sul significato fisiologico delle piastrine del sangue*. Rassegna di Scienze Mediche, marzo-aprile 1894, Anno IX, n. 3.

Mi spinge presentemente a ritornare sulla mia comunicazione di sette anni or sono, illustrandola coi metodi di tecnica, con nuove osservazioni e con figure, un lavoro pubblicato ultimamente da Guarnieri e Daddi (1), nel quale questi autori vengono ad abbracciare la mia opinione sul significato fisiologico delle piastrine. Essi concludono dallo studio del sangue nella clorosi, raccolto ed esaminato in siero metilenico, che le piastrine sono relitti di metamorfosi regressiva nucleinica dei globuli rossi, che trova la sua ragione sufficiente di essere nel metabolismo organico dentro i limiti della vita fisiologica. Gli Autori a questo proposito scrivono: " Questo modo d'intendere la ragione di essere delle piastrine non è nuovo. Alcuni autori, pur riconoscendo la esattezza delle ricerche del Bizzozero, hanno negato alle piastrine il valore di un elemento autonomo. Tacendo di quelli che ne hanno posta la origine in relazione coi leucociti del sangue, e di quelli che hanno considerato le piastrine artifizi di preparazione, negandone l'esistenza nel sangue circolante, noi vogliamo solo ricordare Neumann, Ciaccio, Welti, Vassale, Wlassow, Arnold, i quali in base a ricerche morfologiche e a dati sperimentali sostennero l'opinione, che le piastrine derivassero dalla distruzione dei globuli rossi ".

Orbene mi preme fare osservare che l'opinione da me sostenuta è ben diversa dall'opinione sostenuta da Neumann, Welti, Wlassow, Arnold. Per questi autori le piastrine non sarebbero elementi morfologici normalmente circolanti nel sangue, ma sarebbero prodotte artificialmente dalla distruzione dei globuli rossi. La causa di errore delle osservazioni di Welti fu messa in chiaro da Salvioli (2). Sacerdotti (3) provò che i prodotti di strozzamento descritti da Wlassow, Maximow e Arnold non sono vere piastrine. E Foà (4) nelle sue ricerche, in cui dimostrò la diversa costituzione della piastrina e del corpuscolo interno dell'eritrocito, identificato a torto da Maximow colla piastrina, a proposito delle osservazioni di Wlassow sull'azione

---

(1) Guarnieri e Daddi, *Sulla metamorfosi nucleinica degli eritrociti.* Volume dedicato a Luigi Luciani in occasione del suo giubileo professorale. Milano 1900, Stab. Tip. Società Editrice Libraria.

(2) Salvioli, *Arch. per le Scienze Mediche*, Vol. XV, n. 12, 1891.

(3) Sacerdotti, *Anat. Anzeiger*. Bd. 17.

(4) Foà, *Giorn. della R. Acc. di Med. di Torino*, 1899, n. 12.

delle soluzioni diluite di sublimato corrosivo sugli eritrociti, e di quelle di Arnold sui fenomeni di strozzamento e di successivi distacchi dai globuli rossi di particelle, che dapprima colorate, perderebbero poscia l'emoglobina e diventerebbero piastrine, così si esprime: " I risultati ottenuti dai predetti autori possono spiegarsi facilmente, data la conoscenza che oggi abbiamo del contenuto dei globuli rossi; ma lasciano tuttavia insoluta la quistione dell'identità reale delle piastrine coi *prodotti artificiali* da essi ottenuti ". Ciaccio non pubblicò ricerche in proposito. Soltanto nelle sue lezioni di istologia (1) dettate nella R. Università di Bologna e pubblicate a dispense ad uso degli studenti si legge: " Circa poi all'origine e natura intrinseca di amendue queste maniere di piastrine (piastrine del sangue dei mammiferi e piastrine del sangue dei sauropsidi e degli ictiopsidi) nulla si sa di certo. A me però viene il dubbio che elleno, e specialmente la prima maniera di piastrine, non potessero per avventura essere dei corpuscoli rossi vicini a disfarsi naturalmente; il quale dubbio, se io non erro, parmi rafforzato dalle esperienze del Giannuzzi intorno alla trasfusione del sangue fra animali di diversa classe. Cotesto fisiologo, morto giovane, e di morte miseranda, osservò che tanto i corpuscoli sanguigni senza nucleo, quanto quelli con nucleo, avanti che si disfacciano dentro le vie circolatorie, col ridursi in granelli, impiccoliscono, perdono l'emoglobina, si fanno pallidi, trasparenti e alterabilissimi; caratteri questi che sono comuni alle piastrine sanguigne ".

Come si vede, Ciaccio non fece che esprimere un dubbio vago nella scuola: nulla di determinato vi è nelle parole " potessero per avventura essere dei corpuscoli rossi vicini a disfarsi naturalmente "; e l'argomento che adduce, dell'alterazione che subiscono i globuli rossi nella trasfusione del sangue fra animali di diversa classe, potrebbe, anzi dovrebbe portare a considerare la piastrina un prodotto artificiale della distruzione dei globuli rossi, ossia a negarne l'esistenza normale nel sangue. Invero colla trasfusione del sangue fra animali di diversa classe non si riesce a produrre piastrine. Si hanno prodotti distruttivi dei globuli, ma non mai le piastrine. Ciò io vidi chiaramente trasfondendo sangue di pollo in un coniglio.

---

(1) Ciaccio, *Lezioni di notomia minuta generale*, dettate nella R. Università di Bologna. Seconda dispensa. Bologna, Tip. Gamberini e Parmeggiani, 1890.

Adunque nessuno prima di me ha avanzato l'opinione ed ha cercato con ricerche morfologiche e dati sperimentali di dimostrare che la piastrina deve considerarsi una fase regressiva fisiologica del globulo rosso. Bizzozero sul significato fisiologico e sulla genesi delle piastrine non volle mai pronunciarsi. Egli (1), il vero scopritore di questo terzo elemento normale, che giustamente porta il suo nome, finchè la vista gli resse, ebbe a rispondere alle obbiezioni dei contraddittori, ossia di coloro che negarono la esistenza normale delle piastrine nel sangue e le ripeterono da distruzione dei globuli rossi (Neumann, Mosso, Bremer, Engel, Welti, Wlassow, Arnold, v. Notthaft, Maximow, Fr. Muller, Determann) o dei globuli bianchi (Lilienfeld, Hauser, Zenker, Hlava, Howel, Gibson); e rispose sempre trionfalmente, adducendo, come è noto, da ultimo, la prova inoppugnabile dell'esame della circolazione nell'ala del pipistrello.

Qualche contradditore sorge ancora, ma con ricerche che non resistono ad un severo controllo sperimentale. Così anche recentemente Schwalbe nel lavoro, che ho sopra indicato per la letteratura estesa dell'argomento, accoglie l'opinione del suo maestro Arnold e ammette che le piastrine siano dovute a fenomeni di strozzamento di particelle di sostanza dei globuli rossi, che dapprima emoglobiniche si farebbero quindi incolore, e in parte a fenomeni di distruzione dei globuli bianchi.

Orbene io credo che sia questione di metodi più o meno imperfetti d'esame. Con una tecnica imperfetta i prodotti artificiali di strozzamento e di disfacimento dei globuli rossi e dei globuli bianchi possono essere presi per piastrine; ma con metodi adatti le piastrine si distinguono sempre nettamente dai suddetti prodotti artificiali. Di ciò io potei acquistare la piena convinzione nelle mie ricerche del 1894. Allorquando mi accinsi a quelle ricerche, persuaso che coi metodi fino allora usati difficilmente avrei potuto mettere in evidenza nuovi fatti, mio primo pensiero fu di trovare nuovi mezzi di tecnica, che mentre mettessero in evidenza i fatti fino allora osservati, rivelassero nuove particolarità morfologiche negli elementi del sangue. E dopo numerosi tentativi mi riuscì di trovare un primo

(1) Per la letteratura intorno alle piastrine vedi il lavoro di Schwalbe (« *Untersuchungen zur Blut-Gerinnung* », Braunschweig, Vieweg, 1901), che la riporta molto estesa.

processo di colorazione protoplasmatica, che colora nel modo più elegante le piastrine e il protoplasma dei globuli bianchi, lasciando incolori i nuclei. Questo metodo che dà la immagine delle figure 1, 2 e 3 della tavola, si pratica nel modo seguente in preparati per strisciamento ed essiccamento: con un portaoggetti ben pulito si raccoglie una goccia di sangue appena estratto, e rapidissimamente, con una bacchetta ben rotonda di vetro, di un colpo solo si distende in strato sottilissimo ed omogeneo sul portaoggetti stesso; agitando all'aria, si lascia essiccare, e quindi si colora con una goccia di soluzione satura di fucsina basica in idrato di amilene. L'idrato di amilene deve essere purissimo e della fabbrica Kahlbaum. Conviene che la soluzione colorante non sia vecchia, perchè col tempo perde del suo potere di colorazione. Perciò in un tubetto di vetro si versano 5-10 cc. di idrato di amilene, nel quale si mettono pochi (4-6) centigrammi di fucsina basica finamente triturata; si agita ripetutamente, finchè il liquido abbia preso un color rosso intenso. Allestita così la soluzione satura di fucsina basica in idrato di amilene, si porta una goccia di questa soluzione colorante sul portaoggetti, dove è stato disteso e disseccato il sangue, e si copre col coprioggetti, si esamina il preparato e si assiste, sotto ai propri occhi, al compiersi della colorazione delle piastrine o dei globuli bianchi nel modo sopraindicato, restando del loro colorito naturale emoglobinico i globuli rossi. Questo metodo, come si vede dalle figure, dà eccellenti resultati tanto nel sangue dei vertebrati inferiori, quanto nel sangue dei mammiferi. Da questo primo metodo venni in seguito a parecchi altri metodi, in alcuni dei quali l'emoglobina delle emazie può essere in modo vario fissata e quindi venire poscia colorata, oppure può essere tolta; e in quest'ultimo caso, come vedremo, si ha allora un'immagine, per così dire, negativa dei globuli rossi, restando invece positiva l'immagine delle piastrine e dei globuli bianchi.

Trovato il metodo dell'idrato di amilene alla fucsina basica (si potrebbe colle stesse norme usare l'idrato di amilene al violetto di genziana e avere così le piastrine colorate in azzurro, ma è preferibile l'immagine che dà la fucsina) che metteva in così chiara evidenza le piastrine, subito volli vedere se quei prodotti della disaggregazione dei globuli rossi e dei globuli bianchi, che alcuni osservatori, negando la preesistenza delle piastrine nel sangue, avevano descritto come piastrine, con questo mio metodo si rivelavano real-

mente come tali; volli cioè vedere se riuscivo a produrre con svariati esperimenti artificialmente le piastrine nei mammiferi e nei vertebrati inferiori a globuli rossi nucleati; e provai a iniettare nel coniglio, nel pollo e nella rana, sangue omogeneo ed eterogeneo sotto la cute e nella camera anteriore dell' occhio, a tener dietro alle alterazioni del sangue nella coagulazione, a legare e tenere legato per parecchie ore un tratto di vena piena fra due lacci asettici, a trasfondere, come ho sopra accennato, sangue di pollo nel coniglio.

Nel sangue così trattato ed esaminato col mio metodo dell' idrato di amilene riuscii a produrre e vedere fasi regressive, specie dei globuli rossi, che con metodi imperfetti di esame potrebbero esser prese per piastrine, ma giammai le vere piastrine dei mammiferi e degli ovipari.

Le piastrine del sangue, adunque, come è merito di Bizzozero avere dimostrato, sono un elemento normale circolante nel sangue.

Col suesposto mio metodo e con altri metodi che verrò esponendo, nella linfa estratta con un tubetto capillare di vetro dalle ghiandole linfatiche dei mammiferi (coniglio e cane) e rapidamente distesa ed essiccata sul portaoggetti, si riscontrano numerosi corpuscoli più o meno ben conservati, presentanti i caratteri chimici e morfologici delle piastrine; ma questo reperto è, a mio avviso, da mettersi in rapporto coll' esito finale delle piastrine dei mammiferi, anzichè con la loro genesi. Questi corpuscoli sono numerosi pure nella milza: di regola mancano o sono rarissimi nel midollo delle ossa. Il fatto del trovarsi questi corpuscoli molto numerosi nel succo delle ghiandole linfatiche mette subito innanzi l' opinione di quegli autori, che considerarono le piastrine come derivanti dalla disaggregazione dei leucociti; ma questa opinione perde valore, se si pensa che in molto maggior numero essi elementi dovrebbero trovarsi nel midollo osseo, dove sono tanto numerosi i leucociti polinucleati a protoplasma grossolanamente granuloso e quindi più facilmente disaggregabili dei globuli bianchi delle ghiandole linfatiche. Invece nel midollo osseo i citati corpuscoli di regola mancano assolutamente.

Se questi corpuscoli poi fossero, come i loro caratteri li dimostrerebbero, piastrine, si potrebbe pensare che i citati organi rappresentassero organi formatori di questi elementi e che, come suppose qualche autore, per le vie linfatiche le piastrine entrassero nel cir-

colo sanguigno. Ciò viene però contraddetto dal fatto che nella linfa del dotto toracico detti corpuscoli mancano tanto normalmente (Mosen, Druerbin, Vassale) come anche in condizioni patologiche subito dopo il salasso, dopo iniezioni ripetute di acido solfidrico e di pirodina, quando pure nelle ghiandole linfatiche si trovano accumulati in numero molto maggiore (Vassale). Così non si può pensare che le piastrine dei mammiferi si fabbrichino nella milza, perchè io non potei notare mai nel sangue della vena splenica un numero maggiore di piastrine che nel sangue dell'arteria splenica.

Le piastrine, a mio avviso, si originano in circolo. Nel sangue circolante dei mammiferi e dei vertebrati inferiori (uccelli, rettili, anfibî) da me esaminati si trova normalmente un elemento morfologico del tutto incoloro (Bizzozero), simile per forma ai globuli rossi (Hayem).

Col suddetto mio metodo dell'idrato di amilene alla fucsina le piastrine dei mammiferi, ad esempio, dell'uomo, come si vede nella figura 2, *b*, sono rotonde e di varia grossezza; alcune sono di poco più piccole di un globulo rosso. Lasciando agire a lungo (8-12 ore) la sostanza colorante (il che si ottiene impedendone l'evaporazione con chiusura di paraffina dattorno ai margini del coprioggetti), si vede che i contorni delle piastrine non sono netti, ma presentano corte spine colorate dalla fucsina; in altre parole, si vede che le piastrine sono *ratatinés*, più o meno raggrinzate, il che spiega la diminuzione di volume, per alcune piastrine del resto molto insignificante, rispetto ai globuli rossi. È noto che le piastrine sono elementi molto rattrattili, dotati di contrattilità, per cui esaminate in mezzo liquido si vedono cambiare sovente di forma. Anzi recentemente Deetyen (1) e Dekhuyzen (2), indipendentemente l'uno dall'altro, descrissero tanto nelle piastrine dei mammiferi quanto in quelle degli ovipari, vivaci movimenti ameboidi. Kopsch (3) confermò completamente le ricerche di Deetyen e di Dekhuyzen.

---

(1) Deetyen, *Untersuchungen über die Blutplättchen*, Virchow's Arch., CLXIV, 2, S. 239.

(2) Dekhuyzen, *Ueber die Thrombocyten (Blutplättchen)*. An. Anz., XIX, 21, S. 529.

(3) Kopsch, *Die Thrombocyten des Menschenblutes und ihre Veränderungen bei der Blutgerinnung. Eine Bestätigung der Befunde Deetyen's und Dekhuyzen's*. An. Anz., XIX, S. 541.

Si vede nelle piastrine dei mammiferi colorate col suddetto mio metodo netta la differenziazione delle piastrine in due sostanze, una granulosa ed una omogenea, già descritta da Bizzozero, da Hayem e da altri osservatori. Il metodo, come ho detto, è un metodo di colorazione semplicemente protoplasmatica; i nuclei, come si vede, nei globuli bianchi, restano incolori, omogenei, splendenti; il protoplasma si colora di un bel rosso vivo: ora la porzione protoplasmatica delle piastrine appare appunto vivamente colorata in rosso, la porzione di natura nucleinica appare omogenea, splendente, del tutto incolora, come uno o due punti fortemente refrangenti la luce, per lo più nel mezzo della porzione protoplasmatica. Ed è noto che Lilienfeld (1) diede la prova chimica della presenza di nucleina nelle piastrine; ed anzi per l'alto contenuto delle piastrine in nucleoalbumina propose a questi elementi il nome di Nucleinplättchen. È noto pure che Mondino non solo riconobbe nelle piastrine sostanza nucleinica, ma descrisse fenomeni di scissione nucleare, secondo me, a torto. Le figure che egli dà, sono alterazioni delle piastrine dovute al suo metodo di esame. Io non ho mai potuto vedere fenomeni di scissione delle piastrine col mio metodo. Le piastrine col mio metodo appaiono per regola rotonde, solo eccezionalmente leggermente ovali. Ciò nell'uomo e negli animali da esperimento. Nei camellidi invece, dove, come è noto, i globuli rossi hanno forma elittica, le piastrine più grosse, vale a dire più giovani, col mio metodo (ho avuto recentemente a Modena l'occasione di esaminare il sangue di un dromedario del serraglio Viano) sono prevalentemente elittiche, come si vede dalla figura 3. E nel sangue di dromedario si notano in buon numero ombre colorate in rosso chiaro grosse quanto i globuli rossi o poco più piccole, che hanno l'aspetto di graduati stadî di passaggio del globulo rosso alla piastrina. Simili ombre colorate in rosso chiaro si notano pure nel sangue d'uomo (fig. 2, *a*) e degli animali da esperimento, ma molto più rare, e per lo più si riscontrano ai margini della striscia di sangue essiccato, dove del resto vanno ad accumularsi di preferenza anche le piastrine. Dette ombre colorate più o meno debolmente dalla fucsina aumentano considerevolmente di numero nel sangue di cane in seguito ad avve-

(1) *Arch. f. Anat. und Physiol*, 1892.

lenamento subacuto o cronico di pirodina. Esse sono da ritenersi, come vedremo a proposito di forme omologhe (fig. 1, *a*) del sangue del pollo, globuli rossi vecchi, in decadenza senile, fortemente impoveriti di emoglobina, vischiosi, come notarono anche Guarnieri e Daddi, e quindi facili ad aderire al portaoggetti e a deformarsi, che nell' atto dello strisciamento e dell' essiccamento hanno perduto la loro scarsa emoglobina, molto più diffusibile di quella dei globuli rossi giovani ed adulti. Invero dattorno a queste forme, specialmente quando si trovano a piccoli gruppi, col mio metodo dell' idrato di amilene alla fucsina si nota un tenue alone di emoglobina diffusa.

Le forme più grosse delle piastrine dei mammiferi appaiono col metodo dell' idrato di amilene alquanto più piccole degli eritrociti, perchè sono raggrinzate. Se si trattano con un metodo che le rigonfi alquanto in modo da togliere loro il raggrinzamento, allora, come si vede nella figura 4, prendono un volume pressapoco identico a quello d' un globulo rosso. Il metodo di cui mi sono servito per ottenere le immagini della figura 4, *a* e *b*, è il seguente: disteso ed essiccato all' aria, come sopra, il sangue d' uomo, si toglie l' emoglobina dei globuli rossi versando sopra, del liquido Ripart e Petit (acqua canforata gr. 75, acqua distillata gr. 75, acido acetico glaciale gr. 1, acetato di rame gr. 0,30, protocloruro di rame gr. 0,30), e quindi si colora con una soluzione diluita di metilvioletto nella seguente miscela: acetato di rame gr. 2, potassa caustica gr. 2, acido acetico glaciale gr. 2, acqua distillata gr. 100. Per allestire la soluzione colorante, in 10 cc. di detta miscela si pone 1 cc. di soluzione acquosa di metilvioletto all' 1 %. Portando una goccia di questa soluzione sul portaoggetti ed esaminando il preparato in essa, si vedono le piastrine nettamente colorate in azzurro: esse vengono alquanto rigonfiate e le più grosse assumono pressapoco il volume di un globulo rosso. Il contorno delle piastrine appare netto; appare più intensamente colorata dal metilvioletto la sostanza nucleinica, che prende l' aspetto di un nucleo, nel quale però non si scorge una vera membrana nucleare. Un' immagine della sostanza nucleinica delle piastrine del tutto simile a quello che si ottiene con questo mio metodo venne ultimamente descritta da Deetyen nel sopracitato lavoro, raccogliendo ed esaminando il sangue dei mammiferi in agar al metafosfato di sodio e colorandolo con ematossilina.

Le piastrine del pollo col mio metodo dell'idrato di amilene alla fucsina appaiono simili per forma ai globuli rossi, come si vede nella figura 1, *b*. Solo sono leggermente più piccole, perchè alquanto rattratte; e della rattrazione anche qui sono prova le spine che si vedono colorate alla periferia delle piastrine. Il protoplasma delle piastrine è colorato in rosso dalla fucsina, come nei globuli bianchi. Ordinariamente ai due poli o ad un polo solo delle piastrine si riscontrano dei globicini incolori di sostanza brillante, la quale con altri metodi, come vedremo, risulta costituita di tanti bastoncini varî per numero, simili, benchè più fini, a quelli che si riscontrano nel maggior numero dei globuli bianchi del pollo. Il nucleo è incoloro, perchè il metodo, ripeto, non è che un metodo di colorazione protoplasmatica.

A questo metodo, per così dire, positivo rispetto all'emoglobina, perchè la conserva, si può sostituire un metodo negativo, in cui l'emoglobina degli eritrociti viene tolta. Le piastrine allora perdono il leggero raggrinzamento e prendono forma e volume perfetto di un globulo rosso. Si procede nel modo seguente: al sangue di pollo, disteso ed essiccato all'aria, come ho sopra indicato, si toglie l'emoglobina, versandovi sopra liquido Ripart e Petit; quindi si colora in liquido Ripart e Petit al metilvioletto (10 cc. di liquido Ripart e Petit e 1 cc. di soluzione acquosa di metilvioletto all'1 %); e si esamina il preparato nello stesso liquido colorante. La colorazione avviene istantanea. Le piastrine spiccano col nucleo e il protoplasma colorati dal metilvioletto (fig. 6, *e*) come i globuli bianchi, in mezzo ai globuli rossi, di cui non si vede che il nucleo colorato al centro dello stroma incoloro (fig. 6, *b*). Ad uno o ai due poli della piastrina quella sostanza che col metodo all'idrato di amilene, appariva come globicini incolori brillanti, qui appare a forma di bastoncini incolori simili, benchè più fini, a quelli dei globuli bianchi.

Invece della semplice colorazione col liquido Ripart e Petit al metilvioletto, si può ottenere una elegante doppia colorazione, quale è disegnata nella fig. 5, nel modo seguente: si tengono in pronto le soluzioni: *a*) fucsina acida gr. 2, acqua distillata gr. 100, *b*) verde di metile gr. 2, acqua distillata gr. 100. Tre parti della soluzione *a* si mescolano con due parti della soluzione *b;* si agita, si filtra, e si ottiene la miscela colorante madre, colla quale si allestisce la seguente soluzione glicero-Ripart e Petit: glicerina pura

p. 5, liquido Ripart e Petit p. 5, detta miscela di fucsina acida e verde di metile p. 1, acido formico goccie 3.

Invece di colorire ed esaminare il preparato di sangue essiccato col liquido Ripart e Petit al metilvioletto, si colora e si esamina in detta soluzione colorante glicero - Ripart e Petit alla fucsina acida e al verde di metile. Anche con questo metodo la colorazione è istantanea, e le piastrine (fig. 5, *e, f, g*) spiccano, in mezzo ai globuli rossi a nucleo verde e stroma incoloro (fig. 5, *b*), coi loro nuclei verdi e il protoplasma rosso, colorate come i globuli bianchi (fig. 5, *h*); e si vedono ai due poli o ad un polo solo delle piastrine i citati bastoncini, simili a quelli dei globuli bianchi bastonciniferi, che, come è noto, corrispondono ai globuli bianchi eosinofili dei mammiferi. Nelle piastrine si vede di regola il nucleo nel mezzo della cellula, come negli eritrociti, però non di rado si vede spinto verso una delle estremità della cellula col relativo spostamento del protoplasma (fig. 5, *f, g*); fenomeno, a mio avviso, artificiale, che si produce nel momento della distensione e dell'essiccamento, dovuto alla contrattilità e facilità di cambiar forma delle piastrine medesime.

Il metodo dà ottimi resultati, anche quando venga fissata l'emoglobina; e l'emoglobina degli eritrociti può fissarsi per parecchie (3-6) ore ai vapori di formolo, o meglio per parecchie (4-6) ore nel liquido di Foà (liquido di Müller gr. 100, sublimato corrosivo gr. 2). Avvenuta la fissazione in liquido di Foà, si lava il preparato con soluzione acquosa di cloruro sodio all'1 %; e quindi si colora e si esamina nella soluzione colorante glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e verde di metile. Questo processo dà immagini molto nette ed eleganti anche dei globuli rossi nucleati dei mammiferi, e quindi è un metodo eccellente e molto comodo per lo studio dell'ematopoiesi in questi animali.

L'emoglobina appare di un bel color rosso rubino; il protoplasma delle piastrine e dei globuli bianchi del pollo appare di un color chiaro di rosa; i nuclei naturalmente vengono colorati vivamente dal verde di metile.

Le piastrine del pollo coi suddetti metodi per via secca, come appare chiaro dalle figure della tavola, non solo appaiono simili, ma addirittura identiche per forma e grossezza al globulo rosso. Le piastrine, si può dire, non sono che globuli rossi: il nucleo è identico in entrambi gli elementi; il protoplasma è nell'uno (globulo

rosso) emoglobinico, nell'altro (piastrina) è incoloro, granuloso con reazione microchimica identica al protoplasma dei globuli bianchi.

E questa identità di forma e grossezza delle piastrine appare anche col seguente metodo per via umida: si tiene pronta la miscela di acqua distillata gr. 100, cloruro sodico 0,80, formolo cc. 2; e ad 1 cc. di questa miscela si aggiungono 10 goccie di una soluzione di acido osmico al 2 %. Conviene aggiungere l'acido osmico al momento, in cui si vuol procedere all'esame del sangue, perchè altrimenti col tempo l'acido osmico colla formalina si ridurrebbe completamente, formando un precipitato nero. In questa soluzione di cloruro sodico, formalina e acido osmico si raccoglie un po' di sangue dalla cresta del pollo, e si allestisce il preparato microscopico circondando il vetrino coprioggetti con paraffina per impedire l'evaporazione del liquido. Il liquido è un ottimo fissatore degli elementi morfologici del sangue; le piastrine appaiono incolore nella loro forma ovale del tutto simile alla forma degli eritrociti; le più grosse a un dipresso hanno la stessa grossezza degli eritrociti; è evidente il loro nucleo ovale e ad uno o ai due poli presentano i granuli brillanti descritti col metodo dell'idrato di amilene. Simili granuli brillanti rari (uno o due) si osservano pure in alcuni eritrociti; e questi eritrociti presentanti granuli brillanti debbono ritenersi come eritrociti vecchi, poichè aumentano fortemente di numero, come vedremo, dopo l'iniezione intravenosa di acqua ossigenata, quando il sangue è in via di distruzione e ancora non sono comparse in circolo le forme giovani, che coi suddetti miei metodi si mettono in evidenza nel modo migliore.

Dopo dodici ore di azione dell'acido osmico colla formalina si nota che alcuni dei granuli brillanti delle piastrine hanno ridotto l'acido osmico, e appaiono neri, come se fossero goccioline di grasso; ma per contrario non risultano di grasso, perchè non sono solubili nell'etere e nel cloroformio, e non si colorano in nero, se si lascia agire dodici e più ore una soluzione di cloruro sodico e acido osmico senza l'aggiunta di formolo. È dunque il formolo che favorisce in questi granuli brillanti la riduzione dell'acido osmico.

Dimostrata questa identità di forma e grossezza fra globulo rosso e piastrina nel pollo, può dimostrarsi fra questi due elementi un rapporto funzionale? È questa la domanda che si affaccia subito. Le mie osservazioni ed esperienze dirette a chiarire il significato

fisiologico delle piastrine furono nel 1894 da me eseguite nel sangue degli ovipari e precipuamente del pollo. Le principali mie ricerche sperimentali sono state ora da me per sommi capi ripetute; e i medesimi resultati di nuovo ottenuti sempre più mi confermano nell'opinione allora manifestata.

Io sono più che persuaso con Bizzozero, Hayem, Mondino e Sala, Fusari, Eberth, Schimmelbusch, Sacerdotti, Negri, Deetyen, Dekhuyzen, Kopsch ed altri, che le piastrine degli ovipari sono perfettamente omologhe alle piastrine dei mammiferi. La perfetta corrispondenza fra le piastrine dei mammiferi e le piastrine nucleate dei vertebrati inferiori accennati è della maggiore evidenza, tanto riguardo alla forma in rapporto al globulo rosso rispettivo, quanto riguardo ai fenomeni della trombosi e della coagulazione. Inoltre le piastrine degli ovipari hanno protoplasma dello stesso aspetto del protoplasma delle piastrine dei mammiferi; sono, come le piastrine dei mammiferi, vischiose, e facili a rattrarsi, ad alterarsi, ad aderire ai vetrini e tra di loro, a conglutinarsi in ammassi; si comportano ugualmente di fronte ai varî liquidi di fissazione e di esame del sangue, e alle varie sostanze coloranti; e il loro numero nel sangue varia nello stesso modo, in cui varia il numero delle piastrine dei mammiferi, nelle diverse condizioni patologiche d'esperimento. L'analogia, adunque, è perfetta e coloro che la negano (Neumann, Giglio-Tos, Schwalbe ed altri) non adducono argomenti convincenti. Nè è a dire che le piastrine degli ovipari hanno un nucleo, e le piastrine dei mammiferi ne sono sprovviste. In questi ultimi anni da numerose ricerche (Loevit, Foà, Lavdowsky, Arnold ed altri) è risultato (ed io per osservazioni mie proprie, di cui darò conto a suo tempo quando renderò di pubblica ragione i miei studi sul midollo osseo, sono convinto della verità del fatto) che nei globuli rossi dei mammiferi esiste un residuo del nucleo primitivo. Orbene questo residuo del nucleo primitivo si riscontra pure nelle piastrine dei mammiferi, come si vede dalle immagini dei miei metodi. Le immagini della sostanza nucleinica da me ottenute nelle piastrine dell'uomo col metilvioletto (fig. 4 *a* e *b*) sono del tutto simili a quelle ottenute da Deetyen (1) col suo processo dell'agar al

(1) Deetyen, l. c.

metafosfato di sodio e successiva colorazione coll'ematossilina. Anzi Deetyen questo corpo nucleinico interno delle piastrine dei mammiferi viene a considerare come un vero nucleo, quantunque anch'egli riconosca che è sprovvisto di una membrana nucleare; come del resto alcuni autori hanno voluto considerare un nucleo il residuo nucleare interno degli eritrociti.

Essendo perfetta l'analogia delle piastrine dei mammiferi colle piastrine degli ovipari, non può in queste varie classi di vertebrati non essere pienamente corrispondente il significato fisiologico di questi elementi. Quindi ciò che si verrà a dimostrare circa la funzione e la genesi delle piastrine degli ovipari, varrà senza dubbio per le piastrine dei mammiferi. I miei sforzi però furono per ora concentrati nello studio del sangue del pollo.

Circa la funzione delle piastrine è nota l'opinione di Hayem, che considera la piastrina una fase fisiologica progressiva verso il globulo rosso; onde il nome di ematoblasti che questo autore dà alle piastrine. Secondo Hayem di piastrine se ne avrebbero di incolore e di quelle più o meno colorate da emoglobina; e così gradatamente si arriverebbe al globulo rosso interamente emoglobinico. Queste forme di passaggio, che compaiono nel pollo dopo il salasso e che furono da Hayem considerate come piastrine ossia ematoblasti che vanno in circolo assumendo emoglobina, furono oggetto di profonde indagini per parte di Bizzozero, il quale riuscì in modo indubbio a dimostrare che rappresentano forme giovani, immature, provenienti, negli animali salassati o resi anemici con varie sostanze emolitiche, dal midollo delle ossa. Coi miei metodi per strisciamento (metodo del liquido Ripart e Petit al metilvioletto e del glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e verde di metile) mi fu facile convincermi con Bizzozero dell'origine midollare di questi elementi di regola un po' più grossi degli eritrociti, ora rotondeggianti, ora elittici, a protoplasma pallidamente emoglobinico. Spiccano nei miei preparati nel modo più elegante, anche quando sono in scarso numero: sono (fig. 5, *a* e fig. 6, *a*) più grossi degli eritrociti adulti e delle piastrine; le piastrine e gli eritrociti presentano un nucleo addensato, intensamente colorato dal metilvioletto e dal verde di di metile; il nucleo delle forme giovani immature o eritroblasti è più grosso, finamente reticolato; il loro protoplasma è finamente granuloso, colorato in azzurro dal violetto di metile o in rosso dalla

fucsina acida, come nelle piastrine, le quali però sono colorate più fortemente, e si distinguono facilmente dagli eritroblasti, oltrechè per il nucleo e il volume simile a quello degli eritrociti adulti, anche perchè ai due poli lasciano vedere i globicini o bastoncini splendenti sopradescritti.

In questi ultimi anni è stato introdotto e usato con grande vantaggio per lo studio degli eritroblasti e delle forme giovani dei globuli rossi il Neutralroth (Giglio-Tos, Foà e Cesaris-Demel). Infatti gli eritroblasti in circolo, nel sangue di pollo anemizzato, esaminato in soluzione fisiologica di cloruro sodico all'1 % di Neutralroth, riescono molto evidenti, perchè tosto presentano tutto attorno al nucleo come una cuffia di granuli eritrofili, più spessa ai due poli. Trovo però sempre più comodo fare uso dei suddetti due miei metodi per via secca, perchè non solo si può far l'esame del preparato nel liquido colorante, ma si può dopo anche allestire preparati stabili, che per quanto perdano un po' della loro eleganza, tuttavia in una serie sistematica di ricerche sono molto utili, perchè permettono confronti a volte necessari da un esame all'altro. Per allestire preparati stabili, basterà praticare lavatura rapida in acqua, essiccamento a moderato calore e chiusura in balsamo sciolto in xilolo. Queste forme giovani immature, o meglio questi eritroblasti nel sangue normale del pollo adulto mancano. Ciò io aveva potuto facilmente constatare coi miei suddetti metodi per via secca, ed ho potuto ultimamente confermare col metodo della soluzione fisiologica di cloruro sodico al Neutralroth. Essi compaiono sempre più o meno tardi (24-48 e più ore) secondo l'anemìa maggiore o minore procurata col salasso o dall'azione di sostanze emolitiche; e rappresentano in circolo le forme omologhe dei globuli rossi nucleati dei mammiferi, le quali vengono dal midollo osseo cacciate nel torrente sanguigno per un forte bisogno dell'economia o per un grave disturbo del circolo. E qui giova distinguere queste forme giovani immature dalle forme giovani semplici che si trovano normalmente in circolo. Esaminando in soluzione fisiologica di cloruro sodico al Neutralroth il sangue normale di un pollo adulto, non si trovano eritrociti con la spessa callotta di granuli eritrofili tutt'attorno al nucleo, ossia eritroblasti, ma si trovano in numero molto scarso eritrociti con uno o due fini grani eritrofili alla periferia del globulo. Sono questi gli elementi analoghi ai globuli rossi a granuli eritrofili dimostrati per la prima

volta da Foà e Cesaris-Demel (1) nel sangue dei mammiferi, ossia eritrociti giovani, ma maturi, e quindi da non confondersi con le forme giovani immature o eritroblasti sopradescritti, che compaiono nel sangue dei polli anemizzati.

Questi eritroblasti nel pollo, come pose in sodo Bizzozero, provengono dal midollo osseo e non hanno nessun rapporto funzionale diretto con le piastrine. La piastrina è sempre un elemento incoloro; gli elementi che Hayem considera come forme di passaggio che vanno in circolo assumendo emogloblina, sono eritroblasti, sempre più o meno colorati di emoglobina, che hanno origine nel midollo osseo, dove sono numerosissimi, come per il primo dimostrò Bizzozero, in cariocinesi. Nei preparati di midollo osseo del pollo le piastrine di regola mancano; questa grande scarsezza o mancanza di piastrine nel midollo osseo era stata pure constatata da Sacerdotti (2) nella rana. Le piastrine, a mio avviso, si formano in circolo. Nelle piastrine di rana o di pollo fortemente anemizzati, non ho mai potuto coi miei metodi riscontrare cariocinesi, contrariamente alle osservazioni di Mondino e Sala; e in ciò mi trovo perfettamente d'accordo colle osservazioni di Sacerdotti (2) nella rana e nel tritone. Le cariocinesi nella rana giovane e nella rana anemizzata appaiono della maggiore eleganza, sempre nei suddescritti eritroblasti di Bizzozero, mai nelle piastrine, coi miei metodi del liquido Ripart e Petit al metilvioletto e del liquido glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e verde di metile, tanto usati in via negativa, cioè togliendo l'emoglobina degli eritrociti mediante lavatura del sangue essiccato all'aria con liquido Ripart e Petit, quanto in via positiva, cioè fissando l'emoglobina coll'essiccare il sangue appena disteso ai vapori di formolo e poscia colorendo ed esaminando nei suddetti liquidi coloranti, o con la mia ematossilina all'allume violetto di cromo, acido arsenioso, orange ed eosina. Nel pollo e nel piccione i filamenti cromatici degli eritroblasti in cariocinesi essendo molto più delicati che nella rana, faccio uso per dimostrarli del seguente metodo che mi dà ottimi resultati: strisciamento ed essiccamento all'aria del midollo osseo o del sangue; fissazione per alcune ore nella soluzione di

(1) Foà e Cesaris-Demel, *R. Acc. di Med. di Torino*, 10 nov. 1899, e 22 dic. 1899.
(2) Sacerdotti, l. c.

sublimato corrosivo gr. 6, cloruro sodico gr. 3, acqua distillata gr. 100 cui si aggiunge $^1/_3$ di alcool; quindi colorazione ed esame nella seguente ematossilina: solfato di magnesia gr. 14, acqua distillata gr. 100; ematossilina centig. 20 sciolta a moderato calore, evitando l'ebollizione; raffreddamento e quindi aggiunta di allume crudo gr. 2, eosina solubile in acqua centigr. 20: si lascia stare il miscuglio 24 ore e quindi si filtra e si ha pronta la soluzione colorante. Orbene con questo metodo le cariocinesi appaiono molto evidenti nel midollo osseo ed anche nel sangue circolante del pollo dopo ripetuti salassi, sempre nelle dette emazie giovani immature (eritroblasti di Bizzozero, forme di passaggio di Hayem): non si scorge mai mitosi nelle piastrine, il cui nucleo appare sempre in riposo, del tutto simile, come con gli altri esposti miei metodi, al nucleo in riposo dei globuli rossi adulti. E che gli eritroblasti di Bizzozero nel sangue del pollo fortemente anemizzato siano omologhi dei globuli rossi nucleati circolanti nel sangue dei mammiferi in date condizioni patologiche, anch' essi, come questi ultimi, di origine midollare, si ha una riprova nel fatto che come negli eritroblasti circolanti del pollo, così nei globuli rossi nucleati circolanti dei mammiferi si può riscontrare cariocinesi, come ha constatato Fusari dopo il salasso negli animali da esperimento e come ho potuto vedere io in casi di leucemia spleno-midollare (e conservo i relativi preparati, presentati alla Società medico-chirurgica di Modena) nell'uomo.

Cariocinesi numerose vidi pure negli eritroblasti in circolo nel sangue del colombo nei primi 10 giorni dopo la nascita; ma non ne vidi mai nelle piastrine. Queste mie numerosissime osservazioni mi autorizzano ad escludere in modo assoluto la moltiplicazione per cariocinesi delle piastrine negli ovipari.

Del resto le ricerche di Mondino e Sala furono ripetute metodicamente dal Negri (1) nel laboratorio di Golgi. E Negri conchiude: " che le forme descritte da Mondino e Sala come piastriue in via di scissione non presentano caratteri che ricordino un processo attivo di divisione (mitosi in senso lato); che esse si trovano nel sangue in un periodo nel quale si verifica una leucocitosi straordi-

(1) Negri, *Sulla genesi delle piastrine dei vertebrati ovipari.* Società medico-chirurgica di Pavia, seduta del 25 novembre 1898.

nariamente abbondante; che una serie di osservazioni tra loro concordanti condurrebbe a far ritenere se non con assoluta certezza, almeno con grande probabilità che tali forme siano leucociti „.

Se le forme giovani immature, moltiplicantisi spesso per cariocinesi anche in circolo, sono di origine midollare, e si deve quindi rigettare l'opinione di Hayem che basandosi su queste forme, da lui a torto ritenute piastrine colorate di emoglobina, considera la piastrina come una fase progressiva verso il globulo rosso, ossia un elemento giovane, un ematoblasto, può la piastrina rappresentare una fase regressiva fisiologica del globulo rosso? Io studai nel 1894 coi miei metodi le modificazioni che le piastrine subiscono rispetto al loro numero in svariate condizioni di esperimento e specialmente sotto l'influenza della fatica esagerata nei colombi viaggiatori, della temperatura di 37° nella rana, dopo ripetuti salassi, dopo l'iniezione di pirodina, di acido solfidrico, di acqua ossigenata e dopo la somministrazione di dosi moderate e ripetute di alcool nel pollo; e venni nell'opinione che la formazione delle piastrine avvenga, più o meno rapidamente in circolo, in stretto rapporto coi processi delle combustioni respiratorie e che la piastrina sia uno stadio regressivo fisiologico del globulo rosso.

È bensì vero che molti resultati di esperienze di simil genere possono, riguardo al significato fisiologico delle piastrine, esser portati tanto in favore della dottrina di Hayem, quanto in favore dell'opinione suaccennata. Così dopo il salasso, come è noto, nelle prime ore si ha diminuzione delle piastrine nel sangue: in seguito si ha un notevole aumento; il numero delle piastrine da ultimo ritorna normale, quando il sangue si è rigenerato. Questo aumento delle piastrine nel sangue dopo il salasso può spiegarsi facilmente tanto se si considera che i globuli rossi rimasti in piccolo numero a provvedere alla respirazione e nutrizione dei tessuti, debbano di necessità più rapidamente passare alla loro normale fase regressiva di piastrine, quanto se si ammette con Hayem che dopo una perdita sanguigna debbasi avere una maggiore formazione di piastrine, ossia un' ordinaria crisi ematoblastica per la rigenerazione delle emazie. Ma di questo rapporto fra aumento delle piastrine nel sangue e periodo di rigenerazione dei globuli rossi non sempre si può parlare; ad esempio, a me pare che quanto io ho potuto osservare nel pollo in seguito ad iniezioni di acido solfidrico sotto la cute e di acqua

ossigenata nelle vene deponga in modo assoluto a favore dell'opinione da me per primo avanzata sul significato fisiologico delle piastrine. L'acido solfidrico, come è noto, è un riducente energico, ed è probabile agisca sul sangue da riducente pure l'acqua ossigenata, poichè la cresta del pollo dopo l'iniezione intravenosa di acqua ossigenata si fa e rimane per parecchie ore intensamente cianotica. Nè è a meravigliarsi che l'acqua ossigenata agisca sul sangue da riducente, poichè la chimica ci insegna che se l'acqua ossigenata agisce come ossidante, quando entra in reazione colle sostanze ossidabili, agisce invece da riducente quando entra in reazione con sostanze molto ossidate, facilmente riducibili, combinandosi per affinità l'ossigeno eccedente dell'acqua ossigenata (H_2O_2) coll'ossigeno del corpo molto ossidato per dare ossigeno molecolare (O_2) o libero. Così l'acqua ossigenata venendo a contatto coll'emoglobina ossidata, è verosimile (mi riserbo in seguito di fare ricerche in proposito) che dia luogo a processi di riduzione e a produzione di ossigeno libero. Invero, se si esamina una goccia del sangue del pollo appena fatta l'iniezione endovenosa di acqua ossigenata, si vedono sotto al vetrino svolgere numerose bollicine, con ogni probabilità, di ossigeno libero. Ad ogni modo ciò che è certo e che importa per le mie ricerche in discorso, si è che l'acqua ossigenata, come l'acido solfidrico, dà luogo ad una rapida e intensa emolisi.

Queste due sostanze hanno un'azione emolitica elettiva sui globuli rossi vecchi, e a questo fenomeno si assiste anche *in vitro* sotto il microscopio. Quando il sangue del pollo viene a contenere, in seguito a salassi o ad iniezioni sottocutanee di acido solfidrico, o ad iniezioni endovenose di acqua ossigenata, un buon numero di forme giovani immature o eritroblasti, se si raccoglie, ad esempio e si esamina una goccia di sangue nella soluzione di acqua ossigenata, che si adopera per le iniezioni endovenose, si vede che i primi a perdere l'emoglobina sono i globuli rossi vecchi, resistono invece piuttosto a lungo gli eritroblasti. È per questa azione elettiva dell'acqua ossigenata e dell'acido solfidrico sui globuli rossi vecchi che con queste due sostanze ripetutamente iniettate, in capo a 4-5 giorni si rinnova completamente il sangue del pollo, il quale allora viene a contenere esclusivamente eritroblasti. Questo ringiovanimento totale del sangue del pollo, invece, non si ottiene dopo ripetuti salassi; e ciò si comprende facilmente, perchè col salasso si estraggono

tanto globuli rossi giovani, quanto globuli rossi vecchi, e quindi non si può arrivare ad avere in circolo tutti eritroblasti, come si arriva colle iniezioni suddette.

Orbene in seguito ad iniezioni quotidiane ripetute di una soluzione acquosa concentrata di acido solfidrico sotto la cute, o di acqua ossigenata nelle vene, si ha un rapido ed immediato aumento delle piastrine nel sangue, senza che tenga subito dietro la comparsa di quelle forme, che secondo Hayem sarebbero forme di passaggio dalle piastrine ai globuli rossi, e che noi, invece, abbiamo veduto doversi con Bizzozero riconoscere come eritroblasti di origine midollare. Queste forme compaiono nel sangue circolante, sempre molto tardi (3-4 giorni dopo la prima iniezione). Ora l'aumento rapido ed immediato delle piastrine, che continua sempre intenso nei primi due giorni, in seguito alle iniezioni di dette sostanze riducenti ed emolitiche, non si può far corrispondere ad un periodo di rigenerazione del sangue: corrisponde direttameute ad un periodo di consumo dei globuli rossi ed appoggia quindi necessariamente il concetto che la piastrina sia una forma regressiva fisiologica del globulo rosso. Corrisponde al periodo di rigenerazione del sangue la comparsa più tardiva delle forme di passaggio, o piastrine contenenti emoglobina di Hayem. Invero noi abbiamo veduto come queste forme debbano considerarsi come emazie giovani immature, eritroblasti provenienti dal midollo osseo. E si comprende come il loro aumento nel sangue non avvenga così tosto, dovendosi svolgere nel midollo osseo un processo più rapido del normale, ma sempre relativamente lento, di loro formazione. Al 4.°-5.° giorno, quando la cresta del pollo si è fatta molto pallida e il sangue contiene in massima parte eritroblasti e ben pochi globuli rossi adulti, si sospendono le iniezioni di acido solfidrico e di acqua ossigenata; e il giorno successivo, si vede che il sangue è completamente ringiovanito; e allora a sangue tutto ringiovanito, ossia risultante di eritroblasti, le piastrine sono estremamente rare, si può dire, mancano. Colto il momento in cui il sangue risulta esclusivamente di eritroblasti e non contiene piastrine, ripetendo gli esami del sangue di ora in ora, si assiste dopo 6-8 ore all'invecchiamento dei globuli rossi giovani e quindi alla ricomparsa delle piastrine.

Queste varie modificazioni del sangue circolante (periodo di esagerato aumento di piastrine nei primi due giorni, comparsa quindi

e aumento progressivo degli eritroblasti, diminuzione delle piastrine, totale ringiovanimento, mancanza, si può dire, completa, delle piastrine, invecchiamento graduale delle forme giovani, ricomparsa graduale delle piastrine) in seguito alle iniezioni di acido solfidrico e di acqua ossigenata, si seguono nel modo più facile ed evidente in preparati di sangue per strisciamento col mio metodo del liquido Ripart e Petit al metilvioletto; e in ripetute esperienze si succedono con tale costanza e regolarità, che subito ingenerano la convinzione che la piastrina sia lo stadio regressivo fisiologico del globulo rosso, ossia il globulo rosso che durante i processi delle combustioni respiratorie ha perduto la sua emoglobina.

La soluzione acquosa concentrata di acido solfidrico deve essere purissima per evitare la morte del pollo. Si deve fare uso di acido solfidrico preparato col solfuro di bario. Se ne iniettano, in due o tre volte, 10-20 cc. al giorno secondo il grado di concentrazione della soluzione e secondo il peso del pollo. L'acqua ossigenata, che si inietta, può essere quella del commercio. Nel 1894 mi servii appunto di quella del commercio; avevo l'avvertenza, siccome l'acqua del commercio è acida, di neutralizzare la quantità da iniettarsi con soda al 10 %; filtravo e quindi iniettavo lentamente in una vena dell'ala alla dose di 10 cc., una o due volte al giorno. Facevo gli esami del sangue, dopo l'iniezione, di ora in ora. Al terzo giorno, quando vi era già un forte grado di anemia (il che vedevo dal colorito pallido della cresta), diminuivo la dose tanto di acido solfidrico, quanto di acqua ossigenata.

Queste esperienze da me fatte nel 1894 più volte, furono da me recentemente ripetute. E questa volta invece dell'acqua ossigenata del commercio ho fatto uso di un preparato molto stabile e purissimo di acqua ossigenata al 30 %, messo ultimamente in vendita da Merck. È un preparato molto comodo, certamente preferibile all'acqua ossigenata del commercio, e ad azione molto energica. Ad un pollo del peso di 1 Kg. basterà iniettare il primo giorno due goccie di acqua ossigenata Merck al 30 % diluite in 10 cc. di soluzione fisiologica di cloruro sodico, il secondo e terzo giorno una goccia, il quarto giorno mezza goccia per ringiovanire tutto il sangue dell'animale. Subito dopo l'iniezione il pollo si regge male in piedi, boccheggia, è dispnoico; la cresta si fa intensamente cianotica nei primi due giorni, in seguito diventa sempre più pallida per la forte anemia.

Oltre l' influenza di dette sostanze riducenti ed emolitiche studiai inoltre l' influenza di altri fattori (l' influenza del lavoro muscolare nei colombi viaggiatori, l' influenza della temperatura di 37° nella rana) che attivano i fenomeni della respirazione, e notai un rapido aumento delle piastrine nel sangue. Così sotto l' azione di sostanze che, come l' alcool in dosi moderate e ripetute, rallentano le combustioni organiche si ha nel pollo una rapida diminuzione delle piastrine medesime. Queste ricerche metodiche sulla variazione numerica delle piastrine nel pollo in seguito all' azione dell' alcool furono per mio consiglio eseguite nel 1894 a Reggio dal Dott. Gurrieri coi miei metodi suesposti di tecnica. Non furono ancora da lui pubblicate, perchè finora erano inediti i miei metodi.

Se le piastrine, elementi sempre incolori derivano, come a me sembra vengano a stabilire le mie osservazioni sperimentali surriferite, dai globuli rossi in stretto rapporto coi processi delle combustioni respiratorie, poichè le forme di passaggio o piastrine debolmente colorate con emoglobina di Hayem, che compaiono nel sangue degli ovipari anemizzati, sono eritroblasti midollari, quale sarà nel pollo lo stadio di passaggio che dal globulo rosso conduce alla piastrina?

Nei preparati per strisciamento del sangue normale di pollo coi miei metodi del liquido Ripart e Petit al metilvioletto e del liquido glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e verde di metile, oltre ai globuli rossi vecchi, leucociti e piastrine, si vedono a preferenza ai margini del sangue strisciato, dove del resto hanno tendenza ad accumularsi anche le piastrine, dei globuli rossi per lo più molto deformati, di cui, come si vede nelle fig. 5 e 6, *c*, *d*, lo stroma in parte è jalino come lo stroma dei globuli rossi adulti, in parte è protoplasmatico, colorato nello stesso modo, benchè di una tinta più sbiadita, del protoplasma delle piastrine. Nei preparati, in cui sia stata fissata l' emoglobina ai vapori di formolo o nel liquido di Foà, colorati col mio metodo del liquido glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e al verde di metile, detti elementi appaiono come ombre in parte emoglobiniche, ossia come eritrociti, in cui nel distendimento e nell' essiccamento siasi diffusa in parte la poca emoglobina che contenevano.

Questi globuli rossi in cui nei preparati per strisciamento l'emoglobina facilmente si diffonde, e che si mostrano vischiosi, facilmente

si deformano e vanno a raccogliersi prevalentemente ai margini del preparato, e che coloriti coi metodi suesposti presentano nel loro protoplasma in parte i caratteri del protoplasma emoglobinico, in parte quelli delle piastrine, sono da ritenersi come globuli rossi vecchi, già molto depauperati del loro contenuto emoglobinico. E nello strisciamento questi globuli rossi vecchi, talora, benchè di rado, perdono completamente la loro scarsa emoglobina; e allora nei preparati coloriti coll'idrato di amilene alla fucsina basica, prendono tanto nei mammiferi (fig. 2 *a* e fig. 3, *c, d, e*) come negli ovipari (fig. 1, *a*) l'aspetto di ombre di una tinta color di rosa, che li rivela quali stadî di passaggio dal globulo rosso alla piastrina.

Che detti elementi siano globuli rossi vecchi, in preda a decadenza senile viene provato dal fatto che essi nel pollo aumentano nei preparati per strisciamento del sangue in via di distruzione, ad esempio immediatamente dopo l'iniezione endovenosa di acqua ossigenata; mancano invece o sono rarissimi quando più tardi il sangue del pollo risulta esclusivamente di eritroblasti.

La maggiore diffusibilità della scarsa emoglobina degli eritrociti vecchi in periodo d'involuzione avanzata si constata non solo nei preparati per via secca ma anche, e molto facilmente, nei preparati per via umida.

Raccogliendo in soluzione fisiologica di cloruro sodico all'1 % di Neutralroth sangue di pollo fortemente anemizzato, che contenga un grande numero di eritroblasti, si vede che i primi a perdere l'emoglobina sono i globuli rossi vecchi, resistono a lungo gli eritroblasti, che si rivelano nella maggiore evidenza, oltrechè per la loro maggiore grossezza, per la loro cuffia di granuli eritrofili. Questi globuli rossi vecchi, che nei preparati per strisciamento per la loro vischiosità e aderenza al vetro portaoggetti facilmente si deformano, e nei quali facilmente avviene diffusione della loro scarsa emoglobina, non solo nei preparati per via secca ma anche, e in modo più evidente, nei preparati per via umida presentano nel loro protoplasma i caratteri in parte del protoplasma emoglobinico, in parte del protoplasma delle piastrine. Se si raccoglie sangue normale di pollo in una quantità piuttosto abbondante di liquido Ripart e Petit, si lascia sedimentare in una provetta, e si prende poscia con una pipetta una goccia del sedimento, si colora e si esamina in una goccia del mio liquido Ripart e Petit al metilvioletto, allora si vedono i globuli

rossi adulti (fig. 7, *a*, *b*) col nucleo intensamente colorato dal metil-violetto e lo stroma del tutto jalino, le piastrine (fig. 7, *i*, *k*) leggermente più piccole degli eritrociti con il protoplasma granuloso colorato in violetto e fra queste e gli eritrociti a stroma del tutto jalino, una serie ininterrotta di forme di passaggio (fig. 7, *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h*) che corrispondono a quei globuli dei preparati per strisciamento, che sopra abbiamo visto presentare lo stroma in parte jalino, in parte protoplasmatico e colorato come il protoplasma delle piastrine, e che abbiamo dimostrato corrispondere ai globuli rossi depauperati di emoglobina, in decadenza senile.

Raccogliendo ed esaminando il sangue di pollo normale nella surriferita miscela di cloruro sodico, formolo ed acido osmico, si vedono, come ho sopra notato ad uno o ai due poli delle piastrine dei granuli brillanti che con altri metodi, come abbiamo veduto, si dimostrano fini bastoncini. Qualcuno (uno o due) di questi granuli brillanti si vede pure anche in alcuni eritrociti. E questi eritrociti con granuli brillanti ho già detto come si debbano ritenere eritrociti vecchi, non già eritrociti giovani, perchè i rari granuli eritrofili degli eritrociti giovani non sono visibili con questo liquido di esame, così come non sono con questo liquido di esame visibili i molti granuli eritrofili, che a guisa di cuffia cingono il nucleo degli eritroblasti circolanti nel sangue dei polli anemizzati.

Che poi questi eritrociti del sangue normale che nella miscela di cloruro sodico, formolo, acido osmico appaiono più piccoli, più poveri di emoglobina degli altri e spesso contengono rari granuli brillanti, siano lo stadio di passaggio che dal globulo rosso conduce alla piastrina, viene a mio avviso, stabilito, come ho avuto occasione di far sopra notare, da quanto si osserva nel sangue del pollo in seguito alle iniezioni intravenose di acqua ossigenata al 30 % della fabbrica Merck, diluita in soluzione fisiologica, di cloruro sodico. Raccogliendo ed esaminando il sangue nella miscela di cloruro sodico, formolo ed acido osmico, è facilissimo distinguere gli eritrociti vecchi, nel primo e secondo giorno dagli eritrociti giovani, nel terzo, quarto, quinto giorno dagli eritroblasti, perchè gli eritrociti vecchi per azione dell' acqua ossigenata dopo alcune ore si mostrano molto impiccoliti, più o meno raggrinzati, con numerosi granuli brillanti del tutto simili ai granuli brillanti delle piastrine. I globuli rossi giovani prima, i globuli rossi giovani immaturi, ossia gli eritroblasti

più tardi (al 3.°-4.° giorno) non presentano granuli brillanti e sono molto più grossi degli eritrociti vecchi, i quali nelle loro forme più piccole, per la presenza dei granuli simili a quelli delle piastrine e pel fatto che ai due poli hanno già perduto l'emoglobina, lasciano spesso nell'indecisione se si abbia sotto agli occhi un globulo rosso vecchio fortemente depauperato di emoglobina o una piastrina. In breve si vedono tutti gli stadi di passaggio dei globuli rossi vecchi alle piastrine. Nè è a dubitare che i globuli rossi raggrinzati, impiccoliti, presentanti buon numero di granulazioni brillanti, i quali compaiono in grande quantità in seguito all'azione emolitica dell'acqua ossigenata, siano eritrociti rapidamente invecchiati, poichè se si raccoglie in 3.ª-4.ª giornata di esperimento, quando sono già numerosi in circolo gli eritroblasti, il sangue nella soluzione fisiologica di cloruro sodico al Neutralroth, si vedono pure i suddetti eritrociti raggrinzati, impiccoliti, con granuli brillanti che, come quelli analoghi delle piastrine, non si colorano col Neutralroth, e accanto ad essi si vedono gli eritroblasti molto più grossi, della loro forma normale solita, con la loro cuffia speciale di granuli eritrofili. Se a questo punto della modificazione del sangue, si allestiscono preparati per strisciamento coi suddetti miei metodi di colorazione del liquido Ripart e Petit al metilvioletto e del liquido glicero Ripart e Petit alla fucsina acida e verde di metile, si vedono numerosissime le ombre in parte emoglobiniche, ossia quei globuli vecchi deformati per la loro vischiosità, in cui l'emoglobina è molto diffusibile, e che presentano come abbiamo veduto, nel loro protoplasma i caratteri in parte del protoplasma emoglobinico degli eritrociti, in parte del protoplasma delle piastrine. Gli eritroblasti appaiono ben conservati, poichè nei preparati per strisciamento non si alterano, come si vede chiaramente quando il sangue viene ad essere completamente ringiovanito e vengono perciò a mancare le ombre in parte emoglobiniche ossia i globuli rossi vecchi e le piastrine.

L'aumento di questi globuli rossi che per la diffusibilità della loro emoglobina e la loro vischiosità nei preparati per essiccamento appaiono come ombre deformate in parte emoglobiniche, si constata verificarsi in tutte le condizioni di esperimento producenti l'aumento delle piastrine, e spesso, facendo esami, di ora in ora, del sangue dei polli in corso di esperienza colle iniezioni di acido solfidrico o di acqua ossigenata, si constata precedere l'aumento delle piastrine medesime.

E ciò è un nuovo argomento per riconoscere in dette forme vecchie gli stadî di passaggio dagli eritrociti alle piastrine; i quali stadî di passaggio, ripeto, appaiono numerosi e della maggiore evidenza in seguito alle iniezioni di acqua ossigenata Merck nel sangue raccolto ed esaminato nella miscela di cloruro sodico, formolo e acido osmico. Nei preparati in questa miscela si vede chiaramente che i globuli rossi, che rapidamente invecchiano per l'azione dell'acqua ossigenata, vanno perdendo l'emoglobina, si raggrinzano, si fanno più piccoli, presentano granuli brillanti simili a quelli delle piastrine, in altre parole si trasformano in piastrine.

Questi sono in riassunto i risultati delle mie pazienti e lunghe ricerche del 1894, da me di nuovo recentemente controllati nel laboratorio del mio collega Carbone, sovratutto con esperienze di iniezioni di acqua ossigenata Merck al 30 %.

Se l'opinione da me per primo avanzata e sostenuta con osservazioni ed esperimenti, che mi hanno pienamente convinto, acquisterà in seguito, come io credo fermamente, il valore di dottrina vera, ne verrà un complemento all'opera di Bizzozero, lo scopritore del terzo elemento del sangue, sulla cui genesi e funzione finora non era stata portata alcuna luce. La piastrina, fase regressiva fisiologica del globulo rosso in rapporto coi processi delle combustioni respiratorie, verrebbe ad essere un elemento della più alta importanza, ossia l'indice morfologico delle combustioni respiratorie stesse.

Guarnieri e Daddi, che per le loro ricerche sulla clorosi si sono al pari di me convinti che le piastrine dei mammiferi rappresentano una metamorfosi regressiva fisiologica dei globuli rossi, giustamente osservano che " fino ad ora intorno alla fine naturale dei globuli rossi non sono esistite che delle congetture, come quella, per esempio, della loro scomparsa per una specie di dissoluzione spontanea (Pouchet-Renaut); ora invece con questo nostro modo di vedere a noi sembra, che il destino terminale di questo elemento cellulare risulti assai chiaro ".

Invero le cellule globulifere della milza e del midollo osseo non bastano a spiegare la distruzione del sangue, tessuto labilissimo, continuamente rinnovantesi. Neumann ed altri credono che le cellule globulifere non siano un reperto normale del midollo osseo, ma che si trovino soltanto in condizioni patologiche. Nel midollo osseo del coniglio e del cane sono rarissime, spesso mancano; io le ho trovate

sovratutto in cani in cui aveva poco prima fatto un'ampia operazione cruenta e procurato quindi emorragia estesa e riassorbimento di sangue stravasato. Bizzozero, lo stesso scopritore delle cellule globulifere del midollo osseo dei mammiferi, vide che in qualche caso mancano. Mancano poi, come è noto, nella milza e nel midollo osseo degli ovipari. Così nel pollo, anche dopo una fortissima emolisi procurata colle iniezioni di pirodina, di acido solfidrico o di acqua ossigenata, io non ho mai veduto cellule globulifere nella milza e nel midollo osseo. Si hanno in questi casi, massime nella milza, semplicemente numerose cellule pigmentifere.

Le cellule globulifere, adunque, non possono spiegare la continua distruzione fisiologica del sangue. Come, pertanto, il sangue si distrugge? Se in passato alcuni autori considerarono il microcito o globulo rosso nano come fase di distruzione degli eritrociti dei mammiferi in circolo, oggidì è risaputo che queste forme sono nane in circolo, perchè sono state fabbricate nane nel midollo osseo. In un cane reso fortemente anemico con ripetute iniezioni di pirodina vidi sull'ultimo, col mio metodo della colorazione in liquido glicero-Ripart e Petit, previa fissazione dell'emoglobina in liquido di Foà comparire buon numero di globuli rossi nani, la maggior parte adulti, cioè senza nucleo, alcuni giovani, nucleati; e ucciso l'animale, questi globuli rossi nani nucleati nel midollo osseo riscontrai in grande numero e alcuni in cariocinesi, accanto ai normoblasti e gigantoblasti.

Si distruggono i globuli rossi dissolvendosi in circolo spontaneamente, senza lasciar nessun segno morfologico della loro distruzione? Ma questa congettura di Pouchet-Renaut è a priori poco probabile. Riconoscendo nella piastrina una metamorfosi fisiologica regressiva del globulo rosso, il fenomeno sarebbe chiaro e in tutti i vertebrati omologo.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

Oc. 4 a compens., $^1/_{12}$ immersione omogenea Zeiss.

Fig. 1. Sangue di pollo normale. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. — Colorazione coll'idrato di amilene alla fucsina basica: *a* ombra; *b* piastrine; *c* globuli bianchi bastonciniferi.

Fig. 2. Sangue d'uomo. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. — Colorazione col metodo dell'idrato di amilene alla fucsina basica: *a* ombra; *b* piastrine; *c* linfocito; *d* leucocito polinucleato.

Fig. 3. Sangue di dromedario. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. — Colorazione col metodo dell'idrato di amilene alla fucsina basica: *a*, *b* globuli rossi; *c*, *d*, *e* ombre; *f*, *g*, *h*, *i* piastrine.

Fig. 4. Sangue d'uomo. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. — Trattamento con liquido Ripart e Petit, e quindi colorazione ed esame nella miscela di acetato di rame, potassa caustica, acido acetico al metilvioletto: *a*, *b* piastrine.

Fig. 5. Sangue di pollo anemizzato col salasso. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. — Trattamento con liquido Ripart e Petit, e quindi colorazione ed esame nella miscela glicero-Ripart e Petit alla fucsina acida e al verde di metile: *a* globulo rosso giovane immaturo o eritroblasta; *b* globulo rosso adulto; *c*, *d* globuli rossi vecchi che si riducono nello strisciamento ed essiccamento ad ombre emoglobiniche, il cui protoplasma presenta i caratteri in parte del globulo rosso, in parte delle piastrine; *e*, *f*, *g* piastrine; *h* globulo bianco bastoncinifero.

Fig. 6. Sangue di pollo anemizzato col salasso. — Preparato per strisciamento ed essiccamento all'aria. Trattamento con liquido Ripart e Petit, e quindi colorazione ed esame nel liquido Ripart e Petit al metilvioletto: *a* globulo giovane immaturo o eritroblasta; *b* globulo rosso adulto; *c*, *d* globuli rossi vecchi che si riducono nello strisciamento ed essiccamento ad ombre emoglobiniche, il cui protoplasma presenta i caratteri in parte del globulo rosso, in parte della piastrina; *e* piastrina.

Fig. 7. Sangue di pollo normale, raccolto in liquido Ripart e Petit e quindi colorito ed esaminato in liquido Ripart e Petit al metilvioletto: *a*, *b* globuli rossi adulti; *c*, *d*, *e*, *f*, *g*, *h* varî stadî di passaggio che conducono dal globulo rosso adulto alla piastrina; *i*, *k* piastrine.

Fig. 1.ª

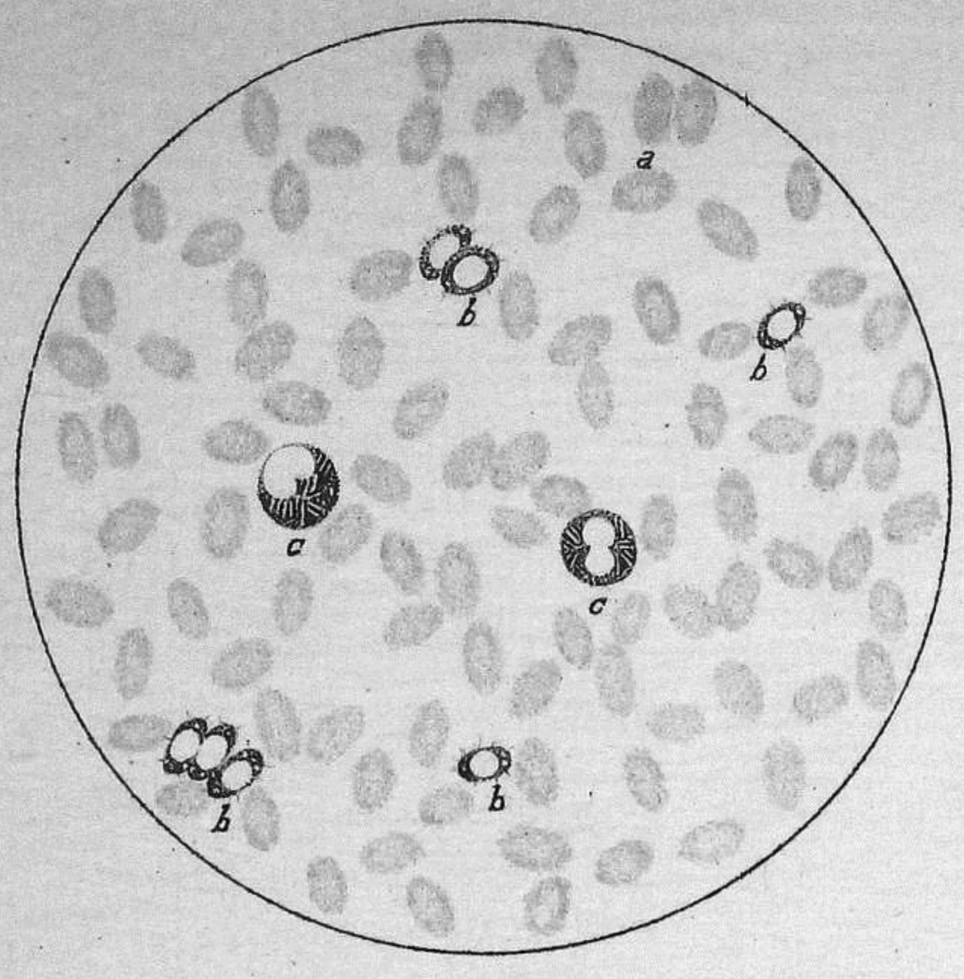

Fig. 2.ª

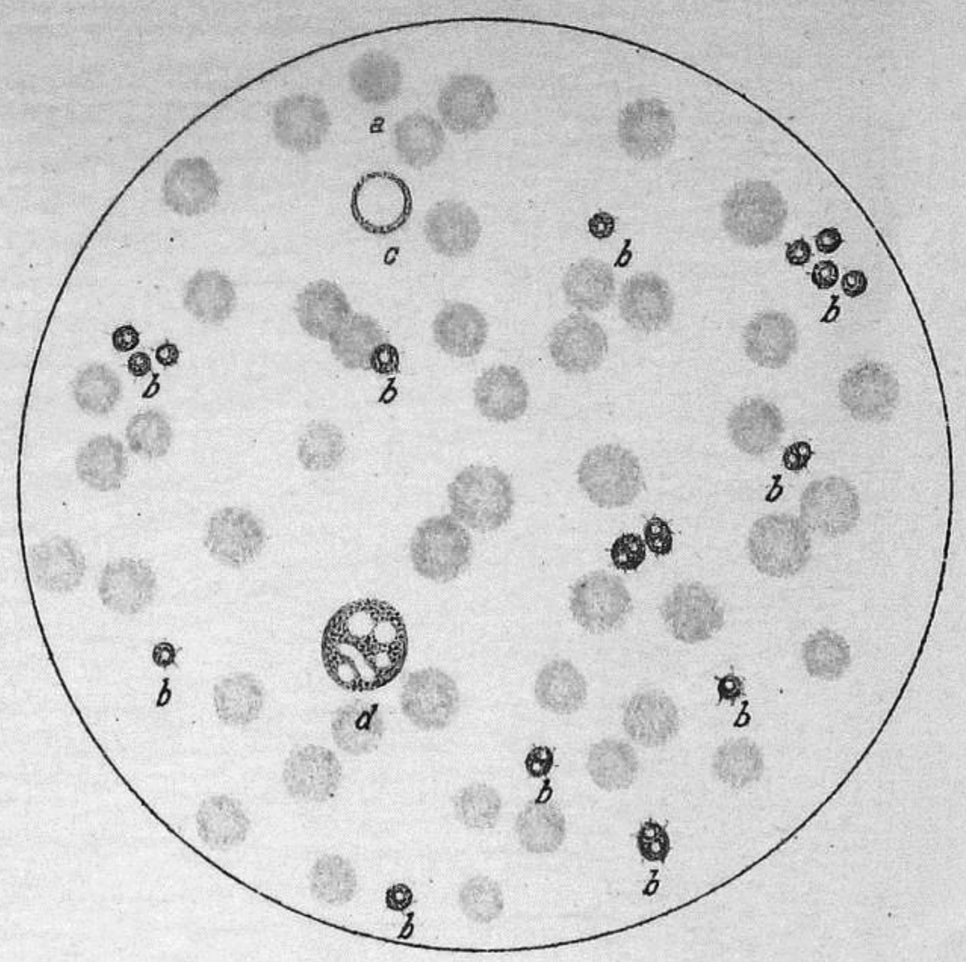

Fig. 3.

Fig. 4.ª

Fig. 5.ª

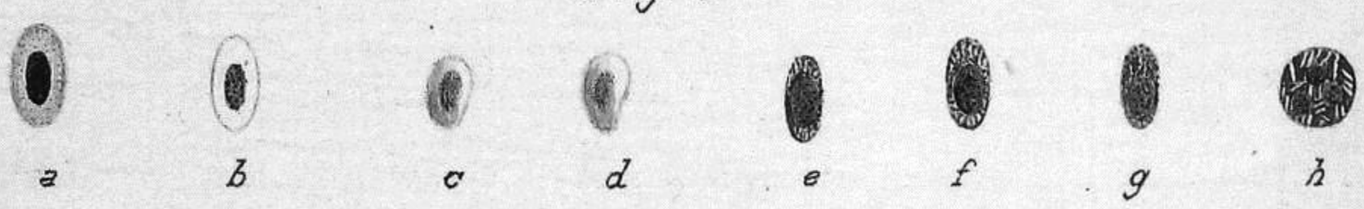

Fig. 6.ª

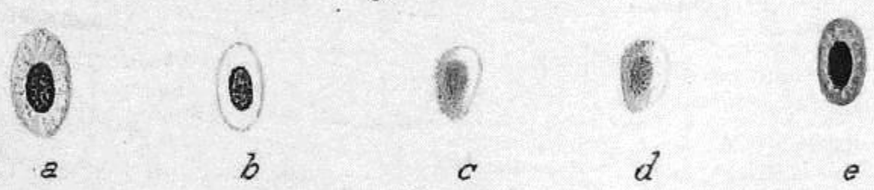

Fig. 7.ª

V. Rinaldi dis. dal vero e cromo-lit. *Lit. A. Dal Re - Modena*